



TITLE:

新しい酵素法によるポリアミン測定について 第1報: 本法における尿中ポリアミン分別定量の基礎的検討

AUTHOR(S):

酒井, 俊助; 伊藤, 康久; 小出, 卓也; 鄭, 漢彬; 原, 明;
沢田, 英夫

CITATION:

酒井, 俊助 ...[et al]. 新しい酵素法によるポリアミン測定について 第1報: 本法における尿中ポリアミン分別定量の基礎的検討. 泌尿器科紀要 1986, 32(3): 327-336

ISSUE DATE:

1986-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/118778>

RIGHT:

新しい酵素法によるポリアミン測定について

第1報 本法における尿中ポリアミン分別定量の基礎的検討

岐阜県立岐阜病院泌尿器科（部長：酒井俊助）

酒井 俊助・伊藤 康久・小出 卓也

長浜赤十字病院泌尿器科（部長：鄭 漢彬）

鄭 漢彬

岐阜薬科大学生化学教室（主任：沢田英夫教授）

原 明・沢田 英夫

DETECTION OF THE URINARY POLYAMINE BY
A NEW ENZYMATIC DIFFERENTIAL ASSAY(I) FUNDAMENTAL STUDY ON A NEW ENZYMATIC
DIFFERENTIAL ASSAY

Shunsuke SAKAI, Yasuhisa ITO and Takuya KOIDE

*From the Department of Urology, Gifu Prefectural Gifu Hospital**(Chief: Dr. S. Sakai)*

Kanhin TEI

*From the Department of Urology, Nagahama Red Cross Hospital**(Chief: Dr. K. Tei)*

Akira HARA and Hideo SAWADA

*From the Department of Biochemistry, Gifu College of Pharmacy**(Director: Prof. H. Sawada)*

A new enzymatic method for determining urinary polyamine concentration by fractionation of the urinary acetyl conjugate into free polyamines with acylpolyamine amido-hydrolase and quantification using two kinds of amine-oxidase of different substrate specificity was examined.

High recovery rates of urinary polyamine by enzymatic hydrolyzation were obtained, namely, $95 \pm 4\%$ for diamine, $95 \pm 1\%$ for spermidine and $99 \pm 2\%$ for spermine. Furthermore, excellent linearity was demonstrated with up to $150 \mu\text{mole/l}$ diamine, up to $75 \mu\text{mole/l}$ spermidine and up to $50 \mu\text{mole/l}$ spermine.

Although urinary polyamine concentration varied diurnally even after correction of urinary creatinine, day-to-day variation disappeared.

In 24-hour pooled urine and voluntary urine, diamine, spermidine and spermine correlated relatively well.

Urinary leukocytes and erythrocytes exerted no influence on urinary polyamine.

Key words: Urinary polyamine, A new enzymatic method

緒 言

1971年, Russell らは悪性腫瘍患者の尿中ポリアミン量を測定し, 健常人より高値を示すことを報告して^{1,2)}以来, 尿中ポリアミンは腫瘍マーカーの1つとして臨床応用が期待されている。さらに, 癌診断法, 化学療法などの治療効果の指標として尿以外の体液および癌組織のポリアミン含量が分析されるようになった。

従来法である高速液体クロマトグラフィ法やアミノ酸分析法などの測定法は精度の点ですぐれているものの, 特別な機器や測定に時間を要するなど臨床応用には問題があった。

尿中ポリアミンはアシルポリアミンとして排泄されるために, 尿中アセチル抱合型ポリアミンを遊離型ポリアミンとして尿中ポリアミンを測定する必要がある。その前処理として加水分解が用いられ, 遊離型にされたポリアミンを基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素にて簡便に分別定量する方法が Otuji らにより確立された³⁾。

現在まで酵素を用いて尿中ポリアミンを測定する報告はみられるものの主として総ポリアミン量を測定するものであり, 臨床的に各種のポリアミンを酵素法にて分別定量したとの報告はみられない。

今回, われわれは上述した酵素法を変法して尿中ポリアミンの分別定量を検討したので報告する。

研 究 方 法

A: 測定原理

本法はポリアミン類 (Diamine=Putrescine+Cadaverine, Spermidine, Spermine) を下記の基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素を用いて酸化し, この反応により生成される過酸化水素を比色定量することにより, Diamine, Spermidine および Spermine を分別定量するものである。

ブトレッシン酸化酵素 (PUO と略): Putrescine, Cadaverine, Spermidine を酸化し, それぞれ1モル量の過酸化水素を生成させるが, Spermine, モノアミン類, 他のジアミン類は酸化しない。

ポリアミン酸化酵素 (PAO と略): Spermidine, Spermine を酸化し, それぞれ1モル量, 2モル量の過酸化水素を生成させるが, モノアミン類, ジアミン類を全く酸化しない。

反応 I: ブトレッシン酸化酵素により Diamine と Spermidine を酸化する。この反応により得られる吸光度 (A_I) は Diamine+Spermidine の量を示す。

Table 1. Method for differential determination of Diamine, Spermidine and Spermine

Reaction I	Spm., Spd., Put., Cad.
	↓ Dia. ↓ Addition of PUO (around PH 8.0) Amount of H_2O_2 = Spd. + Put. + Cad. ↓ Dia.
Reaction II	Spm., Spd., Put., Cad.
	↓ Dia. ↓ Addition of PUO (around PH 8.0) Amount of H_2O_2 = Spd. + Put. + Cad. ↓ Dia. ↓ Addition of PAO (around PH 6.0) Amount of H_2O_2 = 2 Spm. Amount of H_2O_2 = Spd. + Put. + Cad. + 2 Spm. ↓ Dia.
Reaction III	Spm., Spd., Put., Cad.
	↓ Dia. ↓ Addition of PAO (around PH 6.0) Amount of H_2O_2 = 2 Spm. + Spd.
Calculation of Diamine, Spermidine, Spermine	
$Dia = K(A_{II} - A_{III}), Spd = K(A_I + A_{III} - A_{II}), Spm = \frac{1}{2} K(A_{II} - A_I)$	

反応 II: ブトレッシン酸化酵素により Diamine と Spermidine を酸化する。次にポリアミン酸化酵素を添加し, 未反応である Spermine を酸化する。この反応により得られる吸光度 (A_I) は Diamine+Spermidine+2・Spermine の量を示す。

反応 III: ポリアミン酸化酵素により Spermine と Spermine を酸化する。この反応により得られる吸光度 (A_{II}) は Spermidine+2・Spermine の量を示す。したがって Diamine, Spermidine, Spermine は次の式により求められる (Table 1)。

$$Diamine = K(A_I - A_{II})$$

$$Spermidine = K(A_I + A_{III} - A_{II})$$

$$Spermine = 1/2 K(A_{II} - A_I)$$

K: 色原体に由来する係数

尿中ポリアミンは大部分がアセチル抱合体として存在するため, 測定には前処理としてアセチル抱合型ポリアミンを加水分解にて遊離型ポリアミンにする必要がある。加水分解として塩酸加水分解法と acylpolyamine amidohydrolase を用いる酵素加水分解法がある。

B: 測定方法

a) 1. 塩酸加水分解法とカラムクロマトグラフィ
共栓付試験管に尿 10 ml および HCL (35%) 2.5

ml を加え、100°C、6時間加熱後、5,000 xg にて10分間遠心分離した。上清を 5 N および 1 N NaOH にて pH 4~7 に調整した。カラムに上清を添加し、精製水 10 ml (2回) 洗浄後、0.5 N HCL 10 ml にて溶出した。

カラムは 0.5×1.8 cm の陰イオン交換樹脂を含むものを使用した。

2. Diamine, Spermidine および Spermine の分別定量

発色液：4-アミノアンチピリン 10 mg, を含む 0.15 M ホウ酸ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.3) 135 ml に、TOOS 45 mg およびペルオキシダーゼ 2 mg を用時溶解した溶液

酵素液：ポリアミノオキシダーゼ (PAO) 20 U/ml および 4 U/ml, プトレッシンオキシダーゼ (PUO) 180 U/ml および 90 U/ml はそれぞれの酵素原液を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて用時希釈した。

中和剤：3 M リン酸二水素ナトリウム溶液

反応：0.67 M NaOH にて中和されたカラム溶出液 1.5 ml に、発色液 1.35 ml を加え反応 I, II, III を行った。すなわち、反応 I では 30°C にて3分間 preincubation 後、PUO (90 U/ml) 0.05 ml を加え、30°C で20分間反応させ、中和剤 0.1 ml にて反応停止後、555 nm における吸光度 (A_I) を測定した。反応 II では 30°C にて3分間 preincubation 後、PUO (180 U/ml) 0.04 ml を加え、30°C で20分間反応させ、中和剤 0.1 ml で反応を停止させた。中和剤の添

加により PAO の至適 pH とした後、PAO (20 U/ml) 0.01 ml を加え、30°C で10分間反応後、555 nm における吸光度 (A_{II}) を測定した。反応 III では中和剤 0.1 ml を添加し、30°C にて3分間 preincubation 後、PAO (4 U/ml) 0.05 ml を加え、30°C で10分間反応させ 555 nm における吸光度 (A_{III}) を測定した。下記の計算にて尿中ポリアミンの各分別定量の値を求めた (Table 2)。

$$\text{Diamine} = 200 \times (A_{555 \text{ III}} - A_{555 \text{ II}}) (\mu\text{mole/l})$$

$$\text{Spermidine} = 200 \times (A_{555 \text{ I}} + A_{555 \text{ II}} - A_{555 \text{ III}}) (\mu\text{mole/l})$$

$$\text{Spermine} = 100 \times (A_{555 \text{ I}} - A_{555 \text{ II}}) (\mu\text{mole/l})$$

1. 酵素加水分解法とカラムクロマトグラフィ

尿 5 ml に 0.2 M Tricine 緩衝液 (pH 7.5) 5 ml を加え、30°C にて3分間 preincubation 後、acyl-polyamine amidohydrolase (1000 U/ml) 0.1 ml を加え、30°C、1時間酵素加水分解した。加水分解処理尿全量をカラムに添加し、精製水 4 ml で洗浄後、0.5 N HCL 3 ml にて溶出した。溶出液は 0.47 N NaOH にて pH 5~8 に調整し、不足分は精製水を加えて全量を 5 ml とした。

カラムは 0.8×1.1 cm の陰イオン交換樹脂を含むものを使用した。

2. Diamine, Spermidine および Spermine の分別定量

発色液：4-アミノアンチピリン 10.8 mg を含む 0.2 M ホウ酸ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.3) 135 ml に、TOOS 45.5 mg およびペルオキシダー

Table 2. Polyamines differentiation method in urine (acid hydrolysis)

Urine 10 ml		
↓ addition conc. HCl 2.5 ml		
Acid hydrolysis (6 hr.)		
↓ adjustment to pH 6.0~7.0		
Column chromatography		
↓ elution with 10 ml of 0.5 N HCl		
Eluate		
Chromometry		
Reaction I (Spd + Dia)	Reaction II (2Spm + Spd + Dia)	Reaction III (2Spm + Spd)
{ Eluate 0.9 ml	{ Eluate 0.9 ml	{ Eluate 0.9 ml
{ 0.67 N NaOH 0.4~0.6 ml	{ 0.67 N NaOH 0.4~0.6 ml	{ 0.67 N NaOH 0.4~0.6 ml
Mixture	Mixture	Mixture
Colour former 1.35 ml	Colour former 1.35 ml	Colour former 1.35 ml
Mixture 30°C 3 min	Mixture 30°C 3 min	Mixture 30°C 3 min
PUO (90 U/ml) 50 μl	PUO (180 U/ml) 40 μl	3 M NaH ₂ PO ₄ 100 μl
Mixture 30°C 20 min	Mixture 30°C 20 min	Mixture 30°C 3 min
3 M NaH ₂ PO ₄ 100 μl	3 M NaH ₂ PO ₄ 100 μl	PAO (4 U/ml) 50 μl
Mixture	Mixture	Mixture 30°C 10 min
↓	PAO (20 U/ml) 10 μl	↓
555 nm	Mixture 30°C 10 min	555 nm
	↓	
	555 nm	

ゼ 2 mg を用時溶解した溶液。

酵素液・ポリアミノオキシダーゼ (PAO) 200 U/ml および 40 U/ml, プトレッシンオキシダーゼ (PUO) 180 U/ml および 90 U/ml は酵素原液を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて用時希釈した。

中和剤: 3M リン酸二水素ナトリウム溶液

反応: 0.47 M NaOH にて中和した溶出液 1 ml に、発色液 1.8 ml を加え、反応 I, II, III を行った。すなわち、反応 I では 30°C にて 3 分間 preincubation 後、PUO (90 U/ml) 0.05 ml を加え、30°C で 20 分間反応させ、中和剤 0.15 ml にて反応停止後、555 nm における吸光度 (A_{555}) を測定した。反応 II では 30°C にて 3 分間 preincubation 後、PUO (180 U/ml) 0.04 ml を加え、30°C で 20 分間反応させ、中和剤 0.15 ml で反応を停止させた。中和剤の添加により PAO の至適 pH とした後、PAO (200 U/ml) 0.01 ml を加え、30°C で 20 分間反応後、555 nm における吸光度 (A_{555}) を測定した。反応 III では中和剤 0.15 ml を添加し、30°C にて 3 分間 preincubation 後、PAO (40 U/ml) 0.05 ml を加え、30°C で 20 分間反応後、555 nm における吸光度 (A_{555}) を測定した。下記の計算にて尿中ポリアミンの各分別定量の値を求めた (Table 3)。

Diamine = $180 \times (A_{555\text{II}} - A_{555\text{I}})$ ($\mu\text{mole/l}$)

Spermidine = $180 \times (A_{555\text{I}} + A_{555\text{II}} - A_{555\text{III}})$ ($\mu\text{mole/l}$)

Spermine = $90 \times (A_{555\text{I}} - A_{555\text{III}})$ ($\mu\text{mole/l}$)

検体はいずれも測定日まで -20°C にて保存し測定

に用いた。測定値は尿中ポリアミン値 ($\mu\text{mole/l}$) を尿中クレアチニン (g/l) で除した値 ($\mu\text{moles/g. Cr.}$) で求めた。

成 績

尿中ポリアミンの添加回収試験は塩酸加水分解および酵素加水分解の両者にて検討した。尿中ポリアミンの日内変動および日差変動、24 時間畜尿中ポリアミンと早期尿中ポリアミンの比較、尿中ポリアミンに対する尿中白血球・赤血球の影響についての検討は酵素加水分解のみで行った。

1) 添加回収試験および検量線

a) 塩酸加水分解

標準液を用いた尿中ポリアミンの添加回収試験の結果を Fig. 1 に示す。

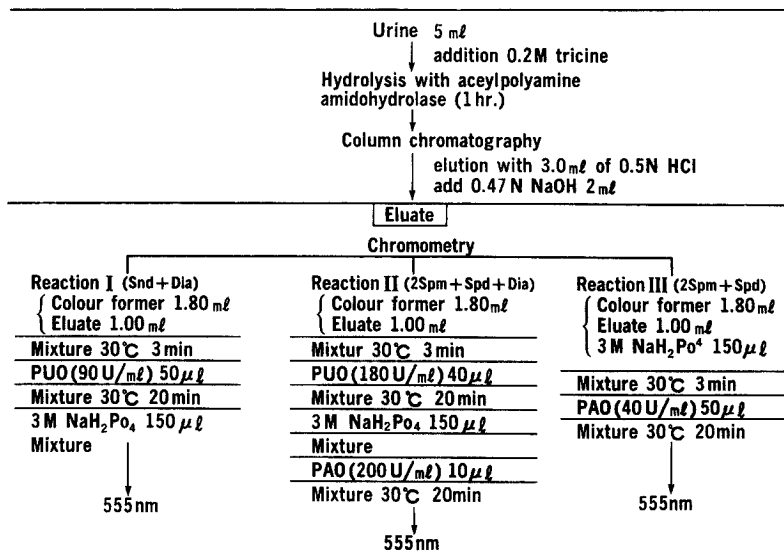
Diamine の回収率は $88 \pm 14\%$, Spermidine のそれは $83 \pm 5\%$, Spermine のそれは $95 \pm 13\%$ であり、いずれも $4-28 \mu\text{mole/l}$ の範囲で良好な成績を得た。

b) 酵素加水分解

標準液を用いた尿中ポリアミンの添加回収試験の結果を Fig. 2 に示す。

Diamine の回収率は $95 \pm 4\%$, Spermidine のそれは $95 \pm 1\%$, Spermine のそれは $99 \pm 2\%$ であり、いずれも良好な成績が得られた。検量線は Fig. 2 に示すごとく、Diamine は $150 \mu\text{mole/l}$, Spermidine は $75 \mu\text{mole/l}$, Spermine は $50 \mu\text{mole/l}$ までいずれも良好な直線が得られた。

Table 3. Polyamines differentiation method in urine (enzymatic hydrolysis)



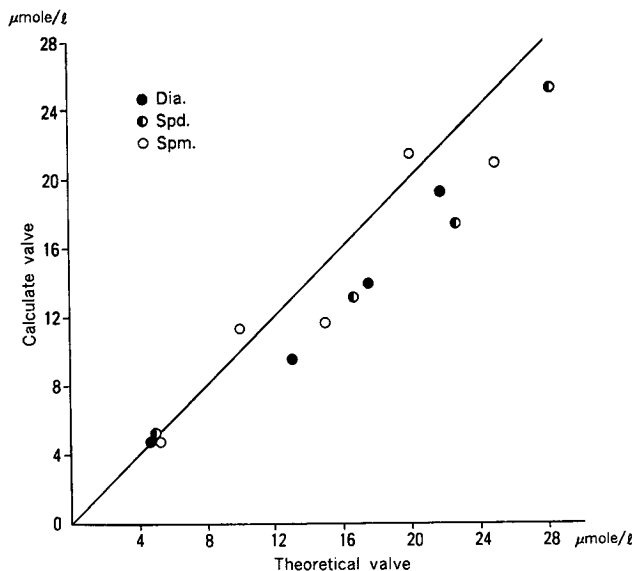


Fig. 1. Recovery of polyamine in urine (acid hydrolysis)

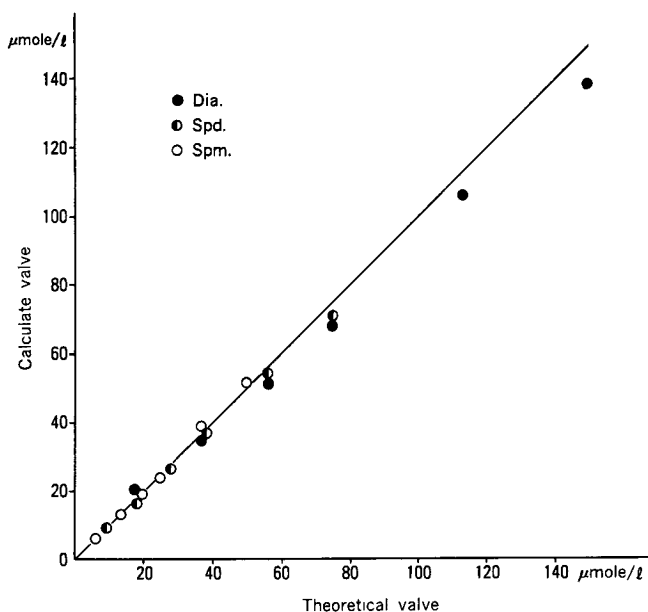


Fig. 2. Recovery of polyamine in urine (enzymatic hydrolysis)

2) 尿中ポリアミンの日内変動

尿中ポリアミンの日内変動を検討するため早朝6時、12時、18時、21時に採尿し、それぞれの尿中ポリアミンを測定した。尿中クレアチニンにて補正した尿中ポリアミンの日内変動を Fig. 3~6 に示す。対象は種々の泌尿器科的疾患を有する入院中の14症例である。

尿中クレアチニンにて補正することにより、尿中ポ

リアミンの日内変動は補正しない場合と比較してバラツキは少ないものの Diamine, Spermidine, Spermine のいずれも日内変動をやはり認めた。Diamine, Spermidine は6時の尿中が最も高く、12時尿において低下し、再度18時尿で増加する傾向が認められた。Spermine の日内変動が最も激しく、一定の傾向は認められなかった。各分別のポリアミン総量は Diamine, Spermidine と同じ傾向を認めた。

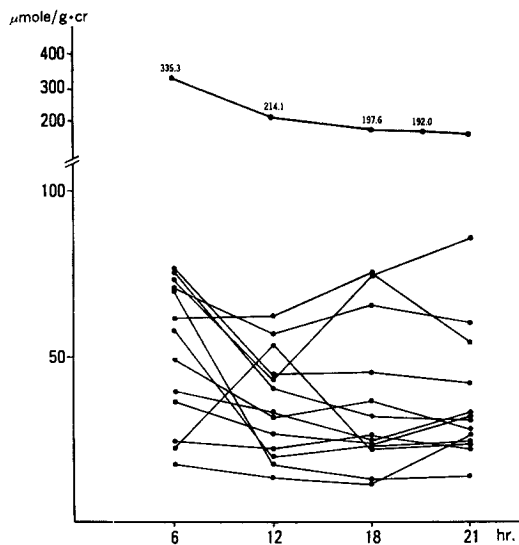


Fig. 3. Diamine level of daily variation in urine (corrected by creatinine)

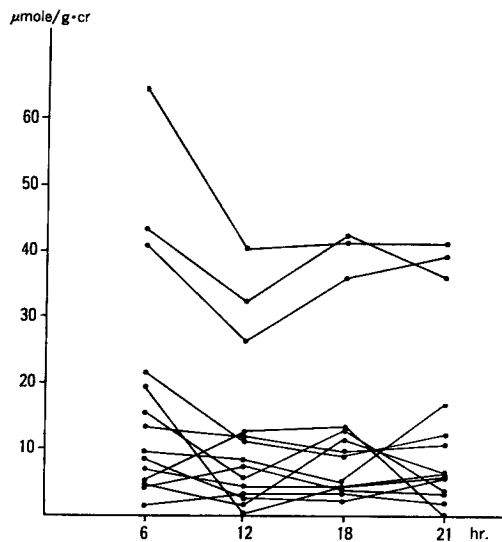


Fig. 5. Spermidine level of daily variation in urine (corrected by creatinine)

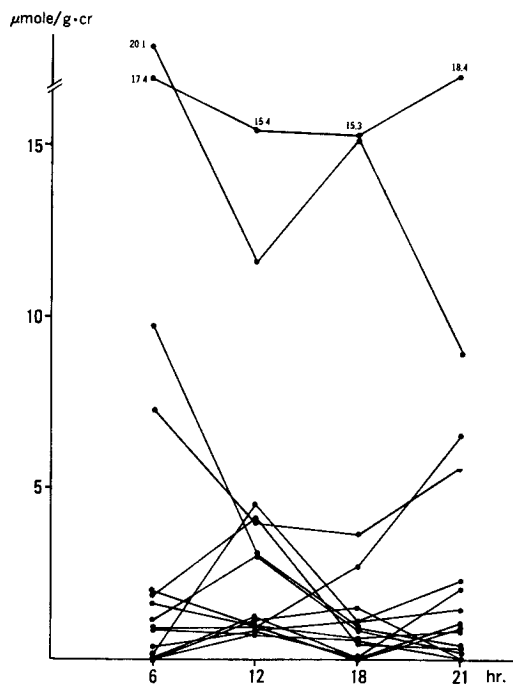


Fig. 4. Spermine level of daily variation in urine (corrected by creatinine)

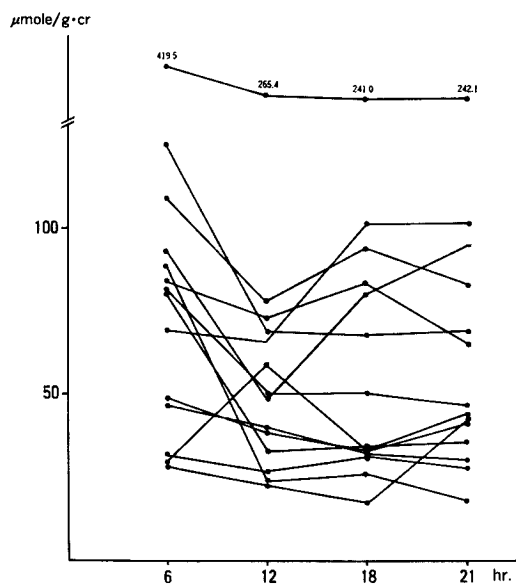


Fig. 6. Total polyamine levels of daily variation (corrected by creatinine)

3) 尿中ポリアミンの日差変動

尿中ポリアミンの日差変動を検討するため3ないし4日間連続の24時間蓄尿を採取し尿中ポリアミンを測定した。尿中クレアチニンにて補正した尿中ポリアミンの日差変動を Fig. 7 に示す。対象は種々の泌尿器

科的疾患を有する入院中の状態が安定している14症例である。

尿中ポリアミンの日差変動は尿中クレアチニン補正によりほぼ一定した値が得られた。

4) 24時間蓄尿と早朝尿における尿中ポリアミンの比

較

24時間蓄尿は入院患者では容易に採取できるが、外来患者ではなかなか困難である。24時間蓄尿中のポリアミンのかわりに早期尿中ポリアミンで代用できるかの検討をするため、24時間蓄尿および早朝尿を採取し、それぞれの尿中ポリアミンを測定した。尿中クレアチニンにて補正した両者の尿中ポリアミンを Fig. 8 に示す。対象は種々の泌尿器科的疾患を有する入院中の14症例である。

Diamine における両者の間には $r = 0.8718$, $y = 1.09x - 3.75$, $n = 14$, Spermidine における両者の間には $r = 0.9188$, $y = 1.06x + 2.18$, $n = 14$, Spermine における両者の間には $r = 0.8061$, $y = 1.09x + 0.83$, $n = 14$ およびそれらのポリアミン総量における両者の間には $r = 0.8733$, $y = 1.14x + 2.27$, $n = 14$ といずれも比較的良好な相関関係が得られた。

5) 尿中ポリアミンに対する尿中白血球・赤血球の影響

尿中白血球・赤血球とも1視野あたり5個以上を positive (+), それ未満を negative (-) として、前立腺肥大症を含む泌尿器科的良性疾患と泌尿器科的悪性疾患別に尿中ポリアミンに対する影響を検討した (Fig. 9)。

尿中白血球 (+) の泌尿器科的良性疾患14例の Diamine の平均は $24.0 \pm 17.6 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $7.2 \pm 3.2 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は

$1.1 \pm 1.4 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であり、泌尿器科的悪性疾患14例の Diamine の平均は $40.7 \pm 34.6 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $9.0 \pm 7.7 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は $2.9 \pm 3.2 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であった。尿中白血球 (-) の泌尿器科的良性疾患23例の Diamine の平均は $19.9 \pm 8.7 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $6.9 \pm 3.9 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は $1.1 \pm 0.7 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であり、泌尿器科的悪性疾患27例の Diamine の平均は $34.7 \pm 25.4 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $13.5 \pm 12.4 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は $2.1 \pm 2.4 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であった。

Diamine, Spermidine, Spermine のいずれにおいても、尿中白血球 (+) の泌尿器科的良性疾患は尿中白血球 (-) のそれに対して有意の差を示さず、泌尿器科的悪性疾患の同様の検討においても有意の差を示さなかった。

尿中赤血球 (+) の泌尿器科的良性疾患6例の Diamine の平均は $31.0 \pm 24.4 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $6.2 \pm 3.5 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は $1.8 \pm 2.0 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であり、泌尿器科的悪性疾患21例の Diamine の平均は $37.2 \pm 29.3 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $16.0 \pm 24.9 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は $2.6 \pm 3.1 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であった。尿中赤血球 (-) の泌尿器科的良性疾患31例の Diamine の平均は $19.6 \pm 8.6 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $7.2 \pm 3.7 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は $1.0 \pm 0.6 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であり、泌尿器科的悪性疾患20例の Diamine の平均は $36.3 \pm 28.5 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermidine は $13.9 \pm 13.7 \mu\text{moles/g. Cr.}$, Spermine は $2.1 \pm 2.2 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であった。

Diamine, Spermidine, Spermine のいずれにおいても、尿中赤血球 (+) の泌尿器科的良性疾患は尿中赤血球 (-) のそれに対して有意の差を示さず、泌尿器科的悪性疾患の同様の検討においても有意の差を示さなかった。

考 察

ポリアミンは生体内の細胞に存在する3つ以上のアミンを有する低分子の非蛋白性脂肪族化合物である。有核細胞に広く存在しているポリアミンとしては、スペルミジンとスペルミンであるが、一般には前駆物質のジアミンであるブトレシンやカダベリンを含めてポリアミンと総称することが多い。

ポリアミンは核酸や蛋白代謝に関与しているため細胞の増殖と密接な関係にあり、悪性腫瘍の診断への応用が期待されている。しかし、高速液体クロマトグラ

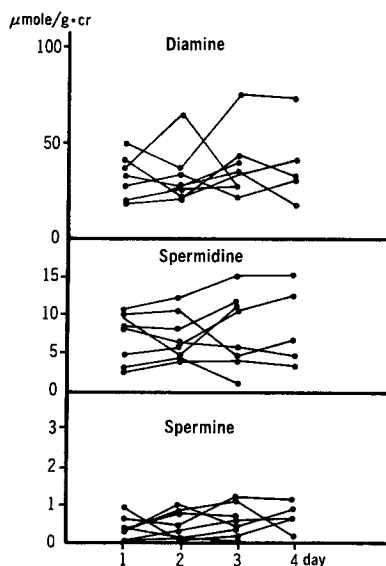


Fig. 7. Polyamine level of day to day variation in urine (corrected by creatinine)

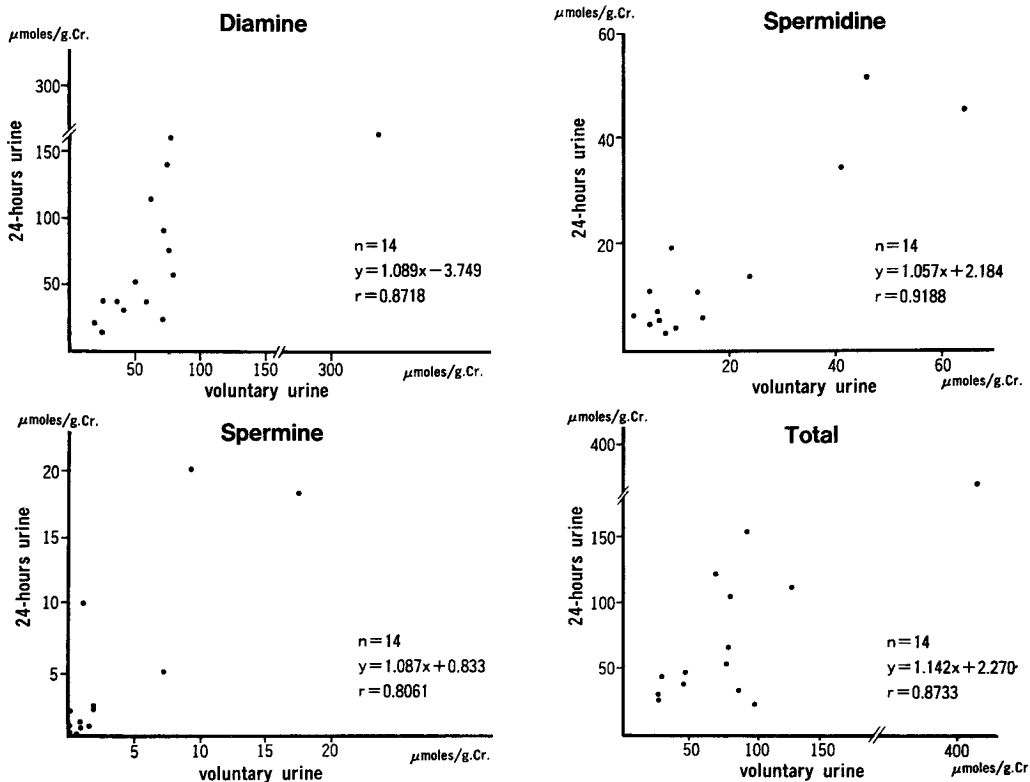


Fig. 8

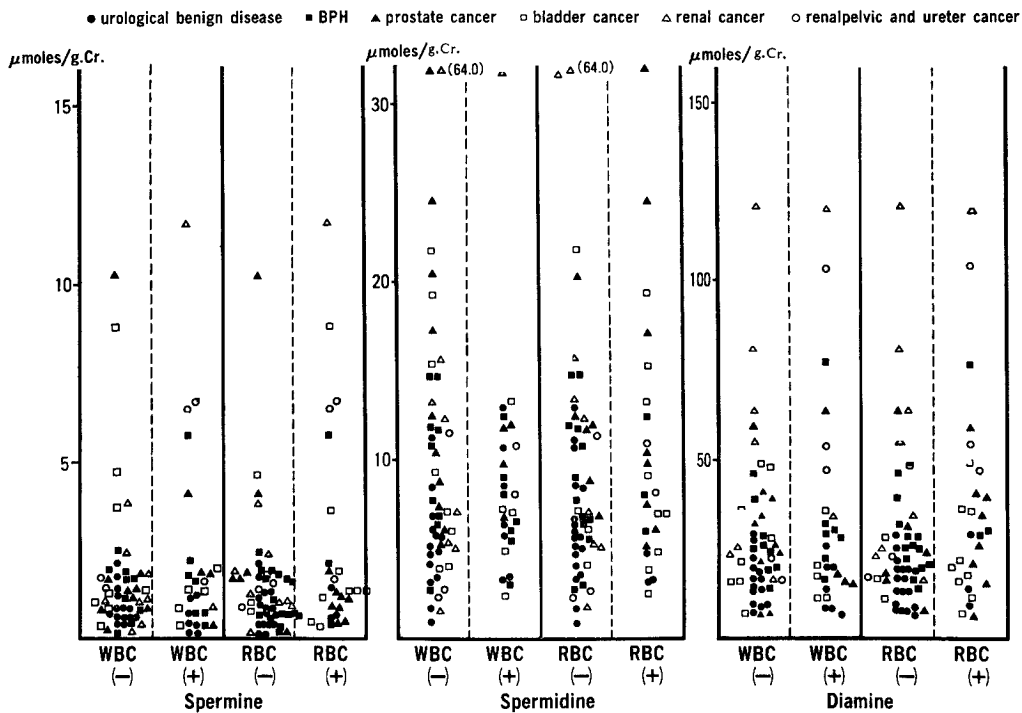


Fig. 9

フィ法やアミノ酸分析法などの従来法は手技が複雑で高価な器具を要するため、手軽に臨床に応用することができなかった。尿中に排泄されるポリアミンは90%以上が抱合型で存在するとされており、加水分解により脱抱合し遊離型ポリアミンとして測定する必要がある。従来は塩酸加水分解が用いられていたが、高温で長時間の条件を有しかつ危険なために非常に複雑であった。最近、塩酸加水分解のかわりに acylpolyamine amidohydrolase の酵素を用いることにより、温和な条件下で加水分解できる方法が開発された⁴⁾。

今回、われわれが用いた測定方法は尿中ポリアミンのアセチル抱合体を acylpolyamine amidohydrolase にて遊離ポリアミンとして、基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素にて簡便に尿中ポリアミンを分別定量できる。

本法における尿中ポリアミンの添加回収試験は塩酸加水分解および酵素加水分解の両者にて検討したが、両者の回収率は Diamine, Spermidine, Spermine のいずれも良好な成績を得た。特に、酵素加水分解は日常考えられる高レベルまで直線性が得られ、臨床的にも十分応用可能と考えられた。

尿中ポリアミンが日内変動を認めることは周知のことであるが、岡部らの報告⁹⁾によれば尿中ポリアミンは日内変動を認めるものの、日内クレアチニンにて補正すれば日内変動は無視できるとされる。しかし、われわれの検討では Fig. 3~6 にみられるように Diamine, Spermidine, Spermine とともに尿中クレアチニン補正しても変動を認めた。尿定量検査ではその物質の排泄量に日内変動を認める場合には、24時間蓄尿が原則とされる。24時間蓄尿は入院患者では容易に採取できるが、外来患者ではなかなか困難なことであり、24時間蓄尿のかわりに尿中クレアチニン補正することにより随意尿での代用可能かどうかの検討がなされている。尿中ポリアミンは日内変動があり、随意尿での代用は困難と思われるが、早朝尿では代用できる可能性があるとの報告⁹⁾がみられる。そのため、われわれも24時間蓄尿と早朝尿における尿中ポリアミンを測定し、尿中クレアチニン補正し両者を比較検討した。Diamine, Spermidine, Spermine とともに両者の間には比較的良好な相関関係が得られ、早朝尿の代用でも可能と考えるが、厳密には24時間蓄尿を原則とすべきと思われた。

尿中ポリアミンは日内変動ばかりでなく、日差変動も認められるが、この場合には尿中クレアチニンで補正すればかなり一定した値が得られると Russell らは報告している⁷⁾ われわれの検討でも Russell らの報

告どおり、尿中クレアチニン補正することによりほぼ一定した値が得られ、治療効果を判定するうえで問題ないものと思われた。

癌疾患ばかりでなく良性疾患においても尿中ポリアミンの著しい高値を示す症例がみられることがあり、その場合には悪性腫瘍の合併も否定できないが Russell らが報告している⁷⁾ ごとく、尿路感染症や尿の細菌汚染に起因するカダベリンの増量による可能性も考慮すべきとされる。そのため、われわれは24時間蓄尿の際には細菌の繁殖を防ぐため防腐剤としてトルエンを使用しており、蓄尿後の尿は測定まで -20°C に保存しておいた。泌尿器科領域の悪性腫瘍患者では尿路感染症や血尿を伴うことが多いため、尿中における白血球および赤血球の存在が尿中ポリアミンにおよぼすことも考えられるため、前立腺肥大症を含む泌尿器科的良性疾患と癌疾患別に検討を加えた。その結果、今回の検討では Diamine, Spermidine, Spermine のいずれも尿中白血球および赤血球による影響をうけなかったが、さらに検討を要する問題と思われた。

尿中ポリアミンは PAP や AFP と異なり、さまざまな癌疾患の腫瘍マーカーとなりうる可能性が高いとされる反面、尿中ポリアミンは早期癌においてはほとんど上昇がみられず、上昇している場合には進行癌症例との報告が散見される^{8,9)}。しかし、最近ポリアミン総量のみの検討では進行症例しか有用でないが、ポリアミンの各分画の定量あるいは血液や尿以外の体液のポリアミン定量が癌の病態を把握するうえで有用との報告¹⁰⁾がみられる。久保田らの開発したポリアミンテスト・エンザイムは Diamine, Spermidine の総量として測定するのに対し、同じ酵素法でも本法は Diamine, Spermidine, Spermine の各分別およびそれらのポリアミン総量を定量できる特長がある。さらに、本法は尿ばかりでなく血液・組織中ポリアミンの分別定量も可能であり現在検討中である。そのため、癌の早期診断法ばかりでなく、手術・化学療法・放射線療法などによる治療効果の判定への応用が期待されるものと考えられる。

結 語

1) 新しい酵素法による尿中ポリアミン測定は尿中アセチル抱合体を acylpolyamine amidohydrolase にて遊離型ポリアミンとして、基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素にてポリアミンの分別定量をする。

2) 本法による尿中ポリアミン測定の基礎的検討を行い以下の結果を得た。

3) 酵素加水分解による尿中ポリアミンの回収率は Diamine $95 \pm 4\%$, Spermidine $95 \pm 1\%$, Spermine $99 \pm 2\%$ と良好な成績を得た。さらに Diamine は $150 \mu\text{mole/l}$, Spermidine は $75 \mu\text{mole/l}$, Spermine は $50 \mu\text{mole/l}$ までいずれも良好な直線性が得られた。

4) 尿中ポリアミンの日内変動はクレアチニン補正にても認められたが、日差変動はクレアチニン補正にて一定した値が得られた。

5) 24時間蓄尿と早朝尿の尿中ポリアミンの比較検討では Diamine, Spermidine, Spermine とともに比較的良好な相関関係が得られた。

6) 尿中ポリアミンは尿中白血球、赤血球による影響をうけなかった。

最後に酵素を供与していただいた天野薬製に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第49回東部連合総会および第73回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Russell DH: Increased polyamine concentration in the urine of human cancer patients. *Nature New Biol* **233**: 144~145, 1971
- 2) Russell DH, Carl CL, Shimpff C and Inega H: Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res* **31**: 1555~1558, 1971
- 3) Otsuji S, Soejima Y, Isobe K, Yamada H, Takao S and Nishi M: An enzymatic differential assay for urinary Diamines, Spermidine and Spermine. *J Cancer Res Clin Oncol* **109**: 115~121, 1985
- 4) 久保田俊一郎・岡田昌人・今堀和友・大沢伸昭: 腫瘍マーカーとしての尿中ポリアミンの新しい簡便、迅速測定法. 医学のあゆみ **124**: 22~24, 1983
- 5) 岡部洋太郎・荒島 功・岡部龍也・中野栄二・河野均也・土屋俊夫: CRP とポリアミン. 臨床病理 **59**: 97~104, 1984
- 6) 久保田俊一郎・大沢伸昭: 酵素学的定量法による測定と臨床応用. 臨床病理 **59**: 64~68, 1984
- 7) Russel DH: Clinical relevance of polyamines as biochemical markers of tumor kinetics. *Clin Chem* **23**: 22~27, 1977
- 8) 遠藤康夫・鮫島啓二郎: ポリアミン. 医学のあゆみ **106**: 282~297, 1978
- 9) Dune BGM, Sydney ES and Russel DH: Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy. *Cancer Res* **37**: 214~221, 1977
- 10) 藤田啓介: ポリアミンとがん. 蛋白質・核酸・酵素 **26**: 1884~1894, 1981

(1985年11月9日迅速掲載受付)